

# Efeito Analgésico de Antagonistas do Receptor da Histamina $H_1$ em Modelo de Dor Provocada por Formalina em Ratos \*

## *Analgesic Effects Of $H_1$ Receptor Antagonists In The Rat Model Of Formalin-Induced Pain*

Hazem Adel Ashmawi, TSA <sup>1</sup>, Leandro Mamede Braun, TSA <sup>2</sup>, Angela Maria Sousa, TSA <sup>3</sup>, Irimar de Paula Posso, TSA <sup>4</sup>

### RESUMO

Ashmawi HA, Braun LM, Sousa AM, Posso IP - Efeito Analgésico de Antagonistas do Receptor da Histamina  $H_1$  em Modelo de dor Provocada por Formalina em Ratos.

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:** Os receptores de histamina mediam vias nociceptivas principalmente no sistema nervoso central. Alguns estudos mostraram efeito analgésico de antagonistas de receptor de histamina no sistema nervoso periférico. Não está claro se o efeito analgésico local é classe específico ou droga específico.

**MÉTODO:** Para responder a essa questão, utilizamos três diferentes antagonistas do receptor  $H_1$  (pirilamina, prometazina e cetirizina) administrados diretamente na pata do rato, pela via intraperitoneal ou por bloqueio de nervo periférico em modelo de dor induzida por formalina. Observamos o efeito das drogas no comportamento do número de elevações da pata.

**RESULTADOS:** Na fase I, a pirilamina local diminuiu o número de elevações da pata de forma dose-dependente. Na dose mais alta, a diminuição foi de 97,8%. Para a prometazina, a diminuição foi de 92% e para cetirizina, 23,9%. Na fase II, a pirilamina diminuiu o número de elevações da pata em 93,5%, a prometazina em 78,2% e a cetirizina em 80,1%. A administração dos fármacos por via intraperitoneal não alterou o comportamento doloroso. Quando utilizadas para bloqueio de nervo periférico, na fase I, a pirilamina diminuiu o número de elevações da pata em 96,7%, a prometazina em 73,3% e a cetirizina em 23,9%. Na fase II, a pirilamina levou à

diminuição de 86,6%, a prometazina de 64,4% e a cetirizina de 19,9%.

**CONCLUSÕES:** Os resultados mostraram que os antagonistas de receptor da histamina  $H_1$  apresentam efeitos analgésicos locais, diferentes do efeito sistêmico, sendo um deles anti-inflamatório e classe específico e o outro específico para prometazina e pirilamina, semelhante a efeito clínico anestésico local.

**Unitermos:** ANIMAIS: ratos; DOR, experimental: formalina; DROGAS: cetirizina; pirilamina; prometazina.

### SUMMARY

Ashmawi HA, Braun LM, Sousa AM, Posso IP – Analgesic Effects of  $H_1$  Receptor Antagonists in the Rat Model of Formalin-induced Pain.

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** Histamine receptors mediate nociceptive pathways, especially in the central nervous system. Some studies have demonstrated the analgesic effects of histamine receptor antagonists in the peripheral nervous system. It is not clear whether the local analgesic effect is class-specific or drug-specific.

**METHODS:** To answer this question, we used three different  $H_1$  receptor antagonists (pyrilamine, promethazine, and cetirizine) administered directly in the paw of the rat, intraperitoneally, or in peripheral nerve blockade in the formalin-induced pain model. The effects of the drugs on the number of paw elevations were observed.

**RESULTS:** In phase I, the local administration of pyrilamine caused a dose-dependent reduction on the number of paw elevations; in the highest dose, the number of paw elevations was reduced by 97.8%. Promethazine decreased it by 92%, while cetirizine decreased by 23.9%. In phase II, pyrilamine decreased the number of paw elevations by 93.5%, promethazine by 78.2%, and cetirizine by 80.1%. Intraperitoneal administration of drugs did not change painful behavior. When used in peripheral nerve block, in phase I pyrilamine reduced the number of paw elevations by 96.7%, promethazine by 73.3%, and cetirizine by 23.9%. In phase II, pyrilamine reduced the number of paw elevations by 86.6%, promethazine by 64.4%, and cetirizine by 19.9%.

**CONCLUSIONS:** The results demonstrate that  $H_1$  receptor antagonists have local analgesic effects, different from the systemic effects, one of them an anti-inflammatory and class-specific effect and the other similarly to the local anesthetic effect, specific for promethazine and pyrilamine

**Keywords:** ANIMALS: rats; DRUGS: cetirizine, promethazine, pyrilamine; PAIN, experimental: formalin.

\* Recebido da (Received from) Laboratório de Investigação Médica (LIM-08) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP), São Paulo, SP

1. Doutor em Medicina; Professor Adjunto do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Carlos; Professor Colaborador do Departamento de Cirurgia da FM/USP e do LIM-08 da FM/USP

2. Médico Assistente da Universidade Federal de Pernambuco

3. Mestre em Farmacologia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; Médica Assistente da Equipe de Controle de Dor da Divisão de Anestesia do Instituto Central do Hospital das Clínicas (IHC) da FM/USP; Pesquisadora do LIM-08 da FM/USP

4. Professor Associado de Anestesiologia do Departamento de Cirurgia da FM/USP; Supervisor da Equipe de Controle de Dor da Divisão de Anestesia do IHC-FM/USP

Apresentado (Submitted) em 19 de dezembro de 2008

Aceito (Accepted) para publicação em 08 de abril de 2009

Endereço para correspondência (Correspondence to):

Dr. Hazem Adel Ashmawi

Av. Dr. Arnaldo, 455/2º andar

01246-903 São Paulo, SP

E-mail: [hazem@hcnet.usp.br](mailto:hazem@hcnet.usp.br); [hazem@ufscar.br](mailto:hazem@ufscar.br)

## INTRODUÇÃO

A histamina, presente na maior parte das células, é um mediador de dor conhecido desde o início do século passado. Ela ativa nociceptores polimodais e produz dor quando injetada na pele humana. Quando ocorre lesão tecidual, a histamina é liberada e ocorrem dor, vasodilatação e edema locais <sup>1</sup>. A ação da histamina é mediada por pelo menos quatro receptores farmacologicamente distintos, todos membros da família de receptores acoplados à proteína G. O receptor  $H_1$  é expresso no cérebro, células endoteliais e células da musculatura lisa. As principais ações do receptor  $H_1$  são a contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular <sup>2</sup>. O receptor  $H_2$  apresenta papel importante na modulação da secreção gástrica ácida e antagonistas de receptor  $H_2$  são amplamente utilizados no tratamento de úlceras gastrointestinais <sup>3</sup>. Os receptores  $H_3$  estão localizados nas terminações nervosas e corpos celulares de neurônios histaminérgicos presentes no núcleo tuberomamilar no hipotálamo. O receptor  $H_3$  age inibindo a condutância ao  $Ca^{2+}$ , diminuindo a despolarização neuronal e liberação de histamina. O receptor  $H_4$  apresenta grande similaridade ao receptor  $H_3$ , mas é expresso em células da linhagem hematopoiética, em particular eosinófilos, mastócitos e basófilos <sup>5</sup>. Muito pouco é conhecido sobre o papel biológico do receptor  $H_4$ . Foi postulado papel na inflamação, visto que o receptor  $H_4$  está limitado às células hematopoiéticas <sup>6</sup>.

O papel da histamina na dor é diferente no sistema nervoso central e no periférico. A histamina central apresenta ações tanto pró-nociceptivas quando antinociceptivas. A histamina aumenta o limiar para dor centralmente <sup>7,8</sup>. O receptor  $H_2$  parece estar envolvido na antinocicepção <sup>9</sup>, enquanto o receptor  $H_1$  está relacionado à ação pró-nociceptiva <sup>8,10</sup>. Os mecanismos propostos para a ação analgésica de antagonistas do receptor  $H_1$  envolvem ação supraespinal, localizada no núcleo dorsal da rafe ou ao redor da substância cinzenta periaquedutal <sup>11</sup>, atuando em receptores pré-sinápticos <sup>8</sup>. Antagonistas do receptor  $H_2$  como a famotidina e lupidina apresentaram ações antinociceptivas quando usadas sistemicamente <sup>12</sup>. Apesar de amplamente expresso no sistema nervoso central, o receptor  $H_3$  não parece estar envolvido na modulação da dor <sup>13</sup>. A histamina presente na periferia está envolvida na estimulação de fibras nociceptivas e seus antagonistas apresentam efeito antinociceptivo, cujo estudo tem sido negligenciado. A pirilamina e a cimetidina apresentaram efeito analgésico após a injeção de formalina na pata de rato <sup>14,15</sup>. Entretanto, não está claro se esse efeito é classe (antagonista do receptor  $H_1$ ) ou fármaco específico.

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito analgésico de três antagonistas do receptor  $H_1$  – prometazina (derivado da propilamina), cetirizina (derivado da piperazina) e pirilamina (derivado da aminopiridina) – injetados na pata ou em bloqueio de nervo periférico, em modelo de dor induzida por formalina em ratos.

## MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados em ratos machos de linhagem Wistar, pesando entre 280 e 350 g, obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais tinham acesso livre a água e alimento e estavam submetidos a ciclo claro-escuro de 12 horas cada. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e de acordo com as diretrizes para investigação de dor experimental em animais acordados da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) <sup>16,17</sup>. Todos os experimentos foram realizados entre 9 e 15 horas.

A dor foi induzida pela injeção de formalina a 1% (50  $\mu$ L) na região dorsal da pata posterior direita do animal. Antes da injeção, os animais eram colocados em câmara de observação de plástico transparente para aclimação ao ambiente durante 20 minutos. Os ratos eram, então, removidos para a administração do fármaco e devolvidos à câmara de observação. Um espelho foi colocado atrás da câmara para facilitar as observações das elevações da pata quando o animal estava com a pata fora do campo visual do observador. Os ratos foram observados logo após a administração da formalina por 45 minutos. O número de elevações da pata foi quantificado a cada cinco minutos. Considerou-se como comportamento de elevação da pata todo movimento não associado à locomoção, variando desde elevação discreta ou contração da musculatura da coxa do animal até movimento mais vigoroso da pata. As elevações eram de fácil observação e quantificação <sup>14,15,18-20</sup>.

O comportamento de elevação da pata foi dividido em fase I (0 a 10 minutos) e fase 2 (11 a 45 minutos) conforme previamente descrito <sup>18,19,21</sup>. Na primeira parte do estudo, 65 animais foram utilizados, divididos em grupos de cinco animais: form (50  $\mu$ L de formalina a 1% injetados na região dorsal da pata posterior direita) foi utilizada como controle positivo. Para cada fármaco foram utilizadas três doses diferentes, sempre administradas juntamente com formalina a 1%, em volume final de 50  $\mu$ L na pata do animal. As doses utilizadas foram: 0,05  $\mu$ mol (pir-0,05, pro-0,05, cet-0,05), 0,25  $\mu$ mol (pir-0,25, pro-0,25, cet-0,25) e 1  $\mu$ mol (pir-1, pro-1, cet-1). Na via intraperitoneal, a dose utilizada foi de 4  $\mu$ mol.kg<sup>-1</sup> em volume final de 200  $\mu$ L; 50  $\mu$ L de formalina a 1% foram injetados na pata.

A segunda parte do estudo foi realizada para avaliar efeito anestésico local clínico dos antagonistas de receptor  $H_1$  através do bloqueio sensitivo da região dorsal da pata. Os fármacos foram injetados de maneira a bloquear os nervos fibulares profundo e superficial, responsáveis pela inervação da região dorsal da pata <sup>22</sup>. A dose utilizada foi de 5  $\mu$ mol em volume de 50  $\mu$ L, injetados no calcanhar dez minutos antes da administração de 50  $\mu$ L de formalina a 1% na pata. Os grupos foram: pir-bloq, pro-bloq, cet-bloq e lido-bloq (dose – 1,85  $\mu$ mol), os grupos lidocaína (lido-bloq) e

formalina (form) foram utilizados como controles. Foi utilizada a dose maior no bloqueio de nervo em relação à dose local (infiltrativa) por ser necessária dose maior de anestésico local para bloqueio de nervo do que para bloqueio de terminações nervosas livres, como na anestesia infiltrativa.

O cloridrato de pirilamina foi obtido da Sigma-Aldrich Pharmaceuticals, USA, o cloridrato de prometazina da Aventis-Pharma, Brasil, o cloridrato de cetirizina da Solvay Pharmaceuticals, Brasil, e o cloridrato de lidocaína da Cristália Prod. Quím. Farm., Brasil.

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) com fator fixo, seguida do procedimento de comparações múltiplas de Tukey. Para estabilizar a variância nos diversos grupos, utilizou-se transformação logarítmica; como o número de elevações da pata foi igual a zero em algumas situações, adicionou-se 0,7 ao valor da variável antes do cálculo do logaritmo. Na segunda parte do estudo para análise das médias dos números de elevações da pata nas fases I e II nos diferentes grupos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Não foi possível a utilização de teste paramétrico em função de a variabilidade dos dados não ser a mesma em todos os grupos, mesmo após o uso de transformações. Quando o teste de Kruskal-Wallis indicou a existência de diferença entre os grupos, o procedimento de comparações múltiplas de Dunnett foi utilizado.

## RESULTADOS

A evolução do número de elevações da pata após a administração de formalina nos diferentes grupos é mostrada nas figuras 1A, 1B e 1C. Na fase I, a pirilamina e a prometazina diminuíram o número de elevações da pata; a prometazina diminuiu as elevações de maneira semelhante nas três doses utilizadas e a pirilamina nas doses de 0,25 e 1  $\mu\text{mol}$  le-

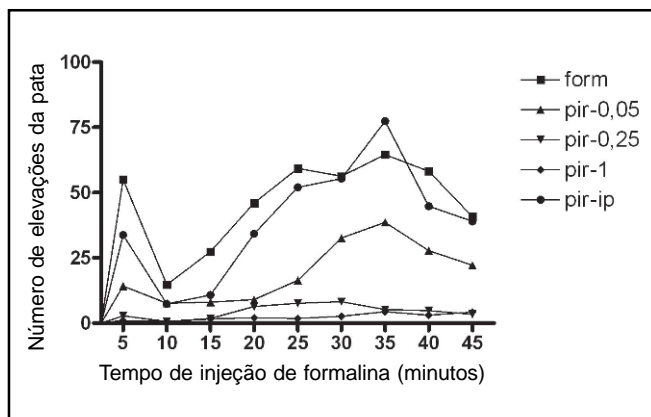


Figura 1A – Efeitos da Pirilamina em Diferentes Doses e Locais de Administração no Número de Elevações da Pata. A pirilamina levou à diminuição do número de elevações da pata de forma dose-dependente quando utilizada por via local. O bloqueio foi quase completo nos grupos pir-0,25 e pir-1. A pirilamina por via intraperitoneal não mostrou efeito analgésico.

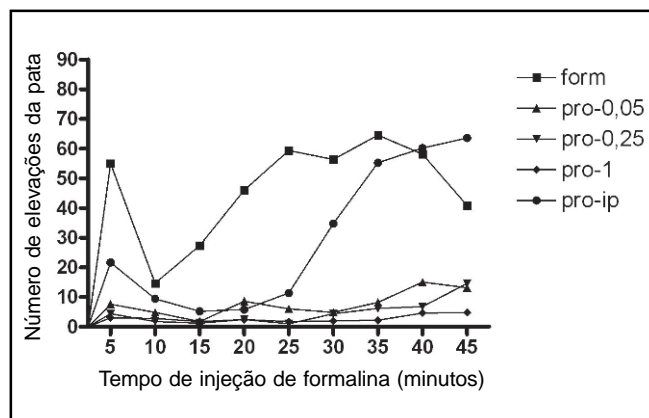


Figura 1B – Efeitos da Prometazina em Diferentes Doses e Locais de Administração no Número de Elevações da Pata. A prometazina diminuiu o número de elevações da pata nas fases I e II, efeito dose-dependente quando utilizada por via local. O bloqueio foi quase completo nos grupos pro-0,25 e pro-1. A prometazina por via intraperitoneal não mostrou efeito analgésico.

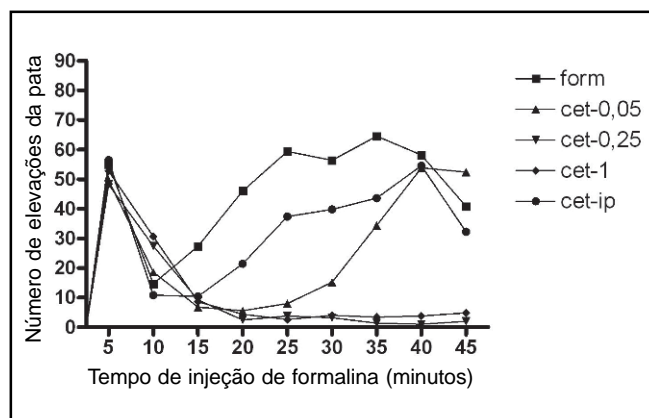


Figura 1C – Efeitos da Cetirizina em Diferentes Doses e Locais de Administração no Número de Elevações da Pata. A cetirizina diminuiu o número de elevações da pata na fase II, efeito dose-dependente quando utilizada por via local. O bloqueio foi quase completo nos grupos cet-0,25 e cet-1. Não houve efeito analgésico na fase I ou quando a cetirizina foi utilizada por via intraperitoneal.

vou a maior bloqueio que na dose de 0,05  $\mu\text{mol}$ . A pirilamina na dose mais alta (1  $\mu\text{mol}$ ) diminuiu o número de elevações da pata em 97,8%, quando comparada à formalina. No grupo prometazina 1  $\mu\text{mol}$  a diminuição foi de 92% e com a cetirizina 1  $\mu\text{mol}$  a diminuição foi de 23,9%, que não foi significativa. Quando pirilamina, prometazina e cetirizina foram utilizadas por via intraperitoneal não houve reduções no número de elevações (figura 2A). Na fase II, os três fármacos levaram à diminuição no número de elevações nas doses de 0,05, 0,25 e 1  $\mu\text{mol}$ , mas o bloqueio foi maior nas doses de 0,25 e 1  $\mu\text{mol}$ . Na dose mais elevada, a pirilamina diminuiu o número de elevações da pata em 93,5%, a prome-

tazina em 78,2% e a cetirizina em 80,1%. Não houve diferenças significativas entre os fármacos. Quando foi utilizada a via intraperitoneal, a pirilamina e a cetirizina não alteraram o número de elevações, mas a prometazina levou a uma diminuição parcial (Figura 2B).

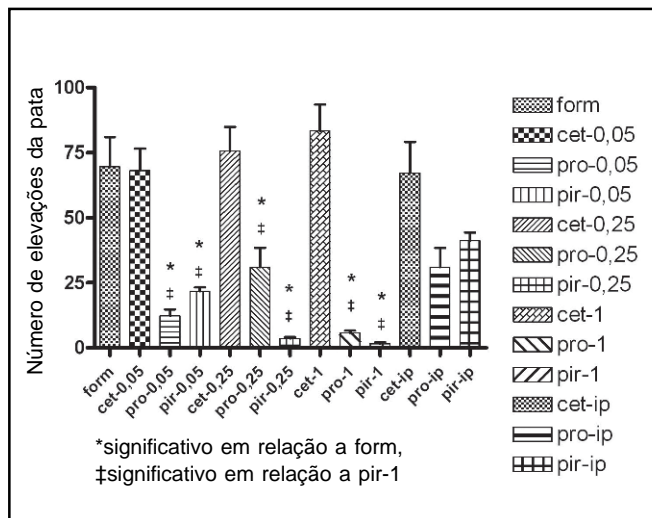


Figura 2A – Efeitos dos Antagonistas de Receptor  $H_1$  por Via Local ou IP no Número de Elevações da Pata na Fase I. A pirilamina e a prometazina bloquearam a fase I em doses mais altas (0,25 e 1  $\mu$ mol), mas não a cetirizina ou quando as drogas foram utilizadas por via IP. Os dados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão,  $p < 0,05$ .

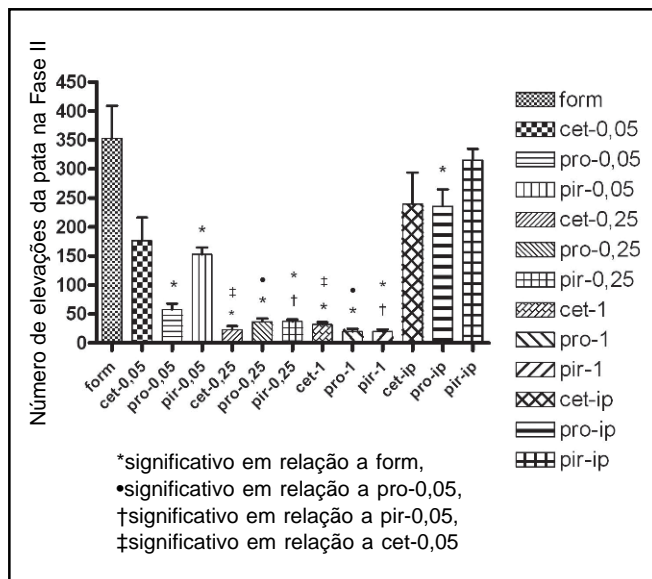


Figura 2B – Efeitos dos Antagonistas de Receptor  $H_1$  por Via Local ou IP no Número de Elevações da Pata na Fase II. Os três fármacos bloquearam a fase II quando utilizadas em doses mais altas (0,25 e 1  $\mu$ mol). Quando por via IP, a pirilamina e a cetirizina não bloquearam a fase II e a prometazina bloqueou parcialmente. Os dados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão,  $p < 0,05$ .

Na segunda parte do estudo, os fármacos foram testados para um efeito anestésico local clinicamente evidenciável. Na fase I, a pirilamina e a prometazina diminuíram o número de elevações da pata em 96,7% e 73,3%, respectivamente, e a cetirizina diminuiu em 23,9%, o que não é significativo quando comparado ao grupo formalina (Figura 3A). Na fase

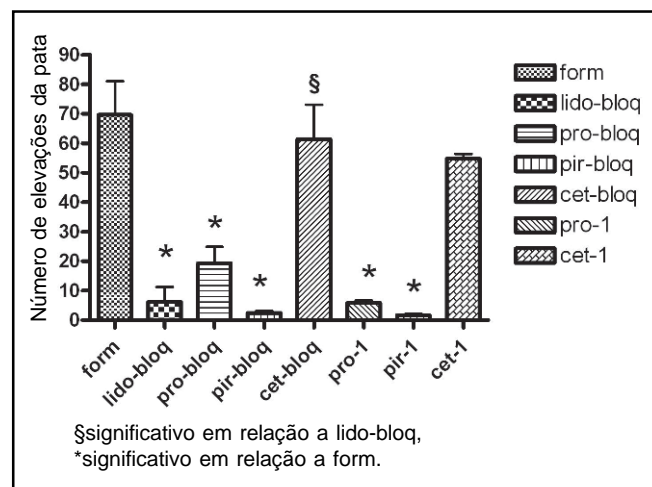


Figura 3A – Número de Elevações da Pata na Fase I para Pirilamina e Prometazina e Cetirizina Utilizadas para Bloqueio de Nervo ou Uso Local. Pirilamina e prometazina bloquearam a fase I quando utilizadas para bloqueio de nervo. Não houve diferença em relação à lidocaína. A cetirizina não bloqueou a fase I quando comparada à lidocaína e não apresentou diferença com a formalina. Os dados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão,  $p < 0,05$ .

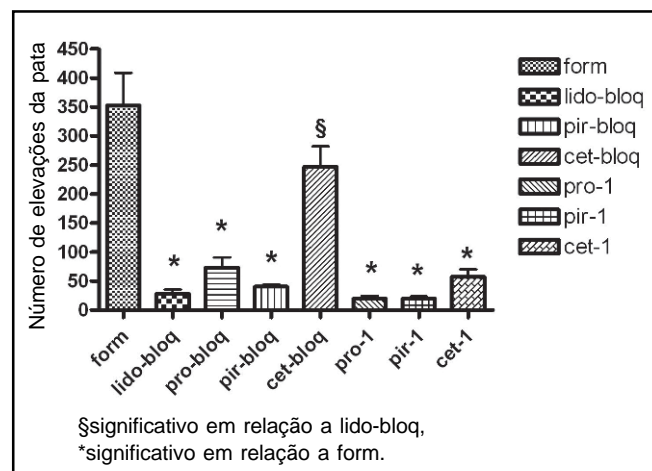


Figura 3B – Número de Elevações da Pata na Fase II para Pirilamina, Prometazina e Cetirizina Utilizadas para Bloqueio de Nervo ou Uso Local. Pirilamina e prometazina bloquearam a fase II quando utilizadas para bloqueio de nervo. Não houve diferença em relação à lidocaína. A cetirizina não bloqueou a fase II quando comparada à lidocaína e não apresentou diferença com a formalina. Os dados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão,  $p < 0,05$ .

II, a pirilamina e a prometazina diminuíram o número de elevações da pata em 86,6% e 64,4%, respectivamente, e a cetirizina em 19,9%, não significativo em relação ao grupo formalina (Figura 3B).

## DISCUSSÃO

Na presente investigação foram avaliados os efeitos analgésicos de três antagonistas do receptor  $H_1$  no modelo de dor provocada por formalina em ratos. O número de elevações da pata foi utilizado para a quantificação do comportamento doloroso induzido pela formalina por apresentar correlação importante com o teste da formalina clássico e com as alterações cardiovasculares em resposta à dor causada pela formalina na pata. Esse tipo de investigação traz correlação confiável sobre o comportamento doloroso em animais conscientes e não submetidos à restrição física. Entre e os vários comportamentos estereotipados no teste da formalina, a frequência de elevação da pata tem sido amplamente utilizada <sup>14,15,18-20,22-24</sup>.

A maior parte dos estudos sobre os efeitos analgésicos de antagonistas de receptores da histamina focalizou os efeitos centrais <sup>8,12,25-27</sup>. Efeitos analgésicos periféricos têm sido menos estudados. Dois trabalhos exploraram os efeitos analgésicos de antagonistas de receptores  $H_1$  e  $H_2$  encontrando efeito analgésico local importante para a pirilamina e, em menor intensidade, para a cimetidina <sup>14,15</sup>. A pirilamina bloqueou as duas fases do teste da formalina, mas não ficou claro se o efeito encontrado era específico da classe (antagonista de receptor  $H_1$ ) ou específico para a pirilamina. Tentou-se esclarecer esse ponto estudando três diferentes antagonistas  $H_1$ : a pirilamina, um derivado da aminopiridina, a prometazina, um derivado da propilamina, e a cetirizina, antagonista mais recente, um derivado da piperazina. Todos os três antagonistas do receptor  $H_1$  apresentaram efeito analgésico local; entretanto, a ação da cetirizina diferiu das ações analgésicas observadas com a pirilamina e a prometazina.

O efeito observado na segunda fase do teste era esperado, já que essa fase do teste deve-se à ação inflamatória local da formalina <sup>18,28,29</sup>. A histamina é um dos mediadores liberados durante a inflamação e que apresentam ação pró-nociceptiva. O efeito anti-inflamatório dos antagonistas de receptor  $H_1$  foi bem observado com a cetirizina, que bloqueou especificamente a fase II. O bloqueio da primeira fase, previamente mostrado para a pirilamina <sup>14,15</sup>, também ocorreu com a prometazina. Esses efeitos não seriam esperados como resultado de ação no receptor  $H_1$ , visto que se acredita que a fase I seja resultado de ativação direta dos nociceptores pela formalina <sup>30,31</sup>. Entretanto, alguns autores acreditam que essa fase também seja inflamatória, da mesma maneira que a fase II <sup>14</sup>. Não acreditamos que a fase I seja inflamatória e um indício foi a cetirizina não ter bloqueado essa fase. A nosso ver, o bloqueio da primeira fase após a coadministração de pirilamina ou prometazina com

a formalina foi muito rápido para ser resultado de ação anti-inflamatória. Os bloqueios das fases I e II não podem ser atribuídos à ação sistêmica, haja vista a administração dos fármacos por via intraperitoneal não ter afetado o número de elevações da pata.

A pirilamina e a prometazina apresentaram efeito analgésico semelhante à lidocaína, observando-se analgesia quando administradas para bloqueio de nervo periférico. Esses dados sugerem que esses antagonistas do receptor  $H_1$  apresentam efeito anestésico local, o que explica o completo bloqueio observado na fase I com ambos os fármacos. Já foi proposto efeito anestésico local para a prometazina <sup>32</sup>, mas não para a pirilamina.

De acordo com os resultados deste estudo, os antagonistas do receptor  $H_1$  apresentaram efeito analgésico local de duas naturezas, um efeito anti-inflamatório, antagonizando os receptores periféricos da histamina  $H_1$  (específico de classe) e um efeito semelhante ao efeito anestésico local, que parece ser fármaco específico (pirilamina e prometazina).

## ***Analgesic Effects Of $H_1$ Receptor Antagonists In The Rat Model Of Formalin-Induced Pain***

Hazem Adel Ashmawi, TSA <sup>1</sup>, Leandro Mamede Braun, TSA <sup>2</sup>, Angela Maria Sousa, TSA <sup>3</sup>, Irimar de Paula Posso, TSA <sup>4</sup>

## INTRODUCTION

Since the last century it has been known that histamine, present in the majority of cells, is a pain mediator. It activates polymodal nociceptors and produces pain when injected in the human skin. Tissue damage releases histamine causing local pain, vasodilation, and edema <sup>1</sup>. The actions of histamine are mediated by at least four pharmacologically distinct receptors members of the family of G-protein-coupled receptors.  $H_1$  receptors are expressed in the brain, endothelial cells and smooth muscle cells. Contraction of the smooth muscle and an increase in vascular permeability are the main actions of  $H_1$  receptors <sup>2</sup>.  $H_2$  receptors play a major role in the modulation of gastric acid secretion, and  $H_2$  receptor antagonists are widely used in the treatment of gastrointestinal ulcers <sup>3</sup>.  $H_3$  receptors are located in nerve endings and body of histaminergic neurons in the tuberomammillary nucleus of the hypothalamus. They inhibit  $Ca^{2+}$  conductance, decreasing neuronal depolarization and histamine release.  $H_4$  receptors are very similar to  $H_3$  receptors, but they are expressed in the hematopoietic cell line, especially eosinophils, mast cells, and basophils <sup>5</sup>. Very little is known on the biologic role of  $H_4$  receptors. A role in inflam-



mation has been postulated since they are limited to hematopoietic cells <sup>6</sup>.

The role of histamine in pain is different in the central and peripheral nervous systems. Central histamine has both pro- and anti-nociceptive actions. Histamine increases the central pain threshold <sup>7,8</sup>.  $H_2$  receptors seem to be anti-nociceptive <sup>9</sup>, while  $H_1$  receptors are pro-nociceptive <sup>8,10</sup>. Proposed mechanisms for the analgesic action of  $H_1$  receptors involve a supraspinal action on pre-synaptic receptors <sup>8</sup> located on the dorsal raphe nucleus or around the periaqueductal gray matter <sup>11</sup>.  $H_2$  receptor antagonists such as famotidine and lupitidine showed antinociceptive actions when used systemically <sup>12</sup>. Although widely expressed in the central nervous system,  $H_3$  receptors do not seem to be involved in pain modulation <sup>13</sup>. Peripheral histamine is involved in the stimulation of nociceptive fibers, and its antagonists show antinociceptive effects whose study has been neglected. Pyrilamine and cimetidine showed analgesic effects after the injection of formalin in the paw of rats <sup>14,15</sup>. However, it is not clear whether this effect is class- ( $H_1$  receptor antagonist) or drug-specific.

The objective of this study was to evaluate the analgesic effects of three  $H_1$  receptor antagonists – promethazine (derived from propilamine), cetirizine (derived from piperazine), and pyrilamine (derived from aminopyridine) – injected in the paw or in peripheral nerve block in the formalin-induced pain model in rats.

## METHODS

Wistar male rats weighing 280 to 350 g from the Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo were used in all experiments. Animals had free access to water and food, and they were exposed to a light-dark cycle of 12 hours each. The study was approved by the Ethics Committee for Analysis of Research Projects of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and according to the directives for experimental pain investigation of the International Association for the Study of Pain (IASP) <sup>16,17</sup>. All experiments were performed between 9 a.m. and 3 p.m.

Pain was induced by the injection of 1% formalin (50  $\mu$ l) on the dorsal aspect of the right posterior paw. Before the injection, animals were placed in a transparent plastic observation chamber for 20 minutes for acclimation. The rats were then removed for the administration of the drug and returned to the observation chamber. A mirror was placed behind the chamber to facilitate the visualization of paw elevations when it was out of the visual field of the observer. Rats were observed for 45 minutes after the administration of formalin. The number of paw elevations was quantified every five minutes. All movements not associated with locomotion, varying from subtle elevation or contraction of the thigh musculature to more vigorous paw movements,

were considered paw elevation. Elevations were easy to observe and quantify <sup>14,15,18-20</sup>.

Paw elevation was divided in phase I (0 to 10 minutes) and phase II (11 to 45 minutes), as previously described <sup>18,19,21</sup>. In the first part of the study, 65 animals were divided in groups of five rats each: the form group (receiving 50  $\mu$ l of 1% formalin in the dorsal aspect of the right posterior paw) was used as positive control. Three different doses of each drug were injected always in association with 1% formalin for a final volume of 50  $\mu$ l in the paw of the animal. The following doses were used: 0.05  $\mu$ mol (pyr- 0.05, pro-0.05, cet- 0.05), 0.25  $\mu$ mol (pyr- 0.25, pro-0.25, cet-0.25), and 1  $\mu$ mol (pyr- 1, pro- 1, cet- 1). For the intraperitoneal route, 4  $\mu$ mol.kg<sup>-1</sup> for a final volume of 200  $\mu$ l were used; 50  $\mu$ l of 1% formalin were injected in the paw.

The second part of the study was undertaken to evaluate the local analgesic effect of  $H_1$  receptor antagonists through the sensitive blockade of the dorsal aspect of the paw. The drugs were injected to block the deep and superficial fibular nerves, responsible for the innervation of the dorsal region of the paw <sup>22</sup>. A dose of 5  $\mu$ mol, at a volume of 50  $\mu$ l, was injected in the heel ten minutes before the administration of 50  $\mu$ l of 1% formalin in the paw. The groups were as follows: pyr-block, pro-block, cet-block, and lido-block (dose – 1.85  $\mu$ mol); the lidocaine (lido-block) and formalin (form) groups were the controls. A higher dose was used in the nerve block than in the local dose (infiltrative) because a higher dose of the local anesthetic was necessary to block the nerve than that used to block free nerve endings, such as in infiltrative anesthesia.

Pyrilamine chloride was supplied by Sigma-Aldrich Pharmaceuticals, USA; promethazine chloride by Aventis-Pharma, Brazil; cetirizine chloride by Solvat Pharmaceuticals, Brazil; and lidocaine by Cristália Prod. Quim. Farm., Brazil.

Analysis of Variance (ANOVA) with a fixed factor followed by Tukey's multiple comparison procedure was used to analyze the data. Logarithmic transformation was used to stabilize variance in the different groups. Since in some situations the number of paw elevations was zero 0.7 was added to the value of the parameter before calculating the logarithm. In the second part of the study the Kruskal-Wallis test was used to analyze the number of paw elevations in phases I and II in the different groups. It was not possible to use parametric tests because the variability of the data was not the same in all groups even after the transformation. When the Kruskal-Wallis test indicated the presence of intergroup differences, Dunnett multiple comparisons was used.

## RESULTS

Figures 1A, 1B, and 1C show the evolution of the number of paw elevations after the administration of formalin in the different groups. In phase I, pyrilamine and promethazine decreased the number of paw elevations; all three doses of promethazine caused a similar decrease in elevation; and

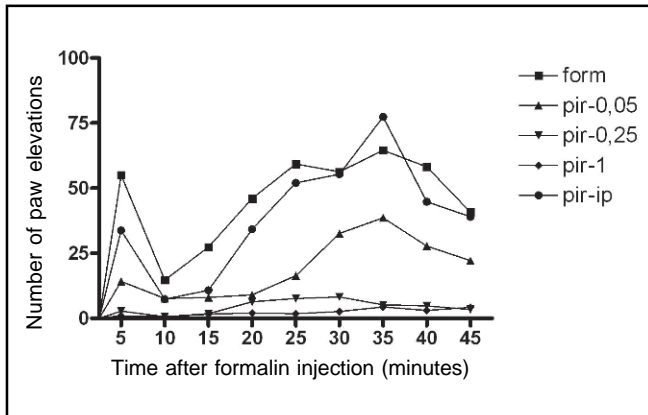


Figure 1A – Effects of Different Doses of Pyrilamine, Administered in Different Sites, on the Number of Paw Elevations. The local administration of pyrilamine showed a dose-dependent reduction in the number of paw elevations. The blockade was almost complete in the pyr-0.25 and pyr-1 groups. Intraperitoneal pyrilamine did not show anesthetic effects.

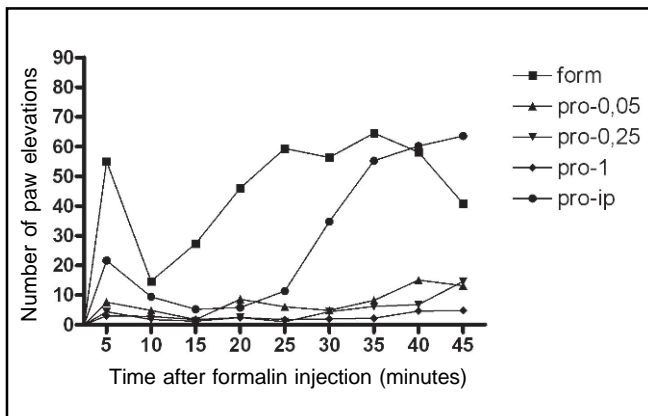


Figure 1B – Effects of Different Doses of Promethazine, Administered in Different Sites, on the Number of Paw Elevations. The local administration of promethazine showed a dose-dependent reduction in the number of paw elevations in phases I and II. The blockade was almost complete in the pro-0.25 and pro-1 groups. Intraperitoneal promethazine did not show analgesic effects.

0.25 and 1  $\mu\text{mol}$  of pyrilamine caused a greater blockade than 0.05  $\mu\text{mol}$ . The highest dose of pyrilamine (1  $\mu\text{mol}$ ) decreased the number of paw elevations by 97.8% when compared to formalin. In the promethazine group, 1  $\mu\text{mol}$  reduced paw elevation by 92%, and 1  $\mu\text{mol}$  of cetirizine decreased it by 23.9%, which was not significant. The intraperitoneal administration of pyrilamine, promethazine, and cetirizine did not reduce the number of elevations (Figure 2A). In phase II, all three drugs in the doses of 0.05, 0.25, and 1  $\mu\text{mol}$  reduced the number of elevations, but the blockade was greater with 0.25 and 1  $\mu\text{mol}$ . In the highest dose, pyrilamine decreased the number of elevations by 93.5%, promethazine reduced by 78.2%, and cetirizine by 80.1%.

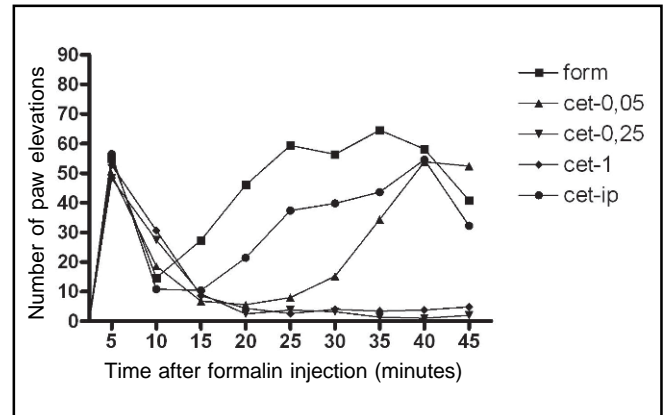


Figure 1C – Effects of Different Doses of Cetirizine, Administered in Different Sites, on the Number of Paw Elevations. The local administration of cetirizine showed a dose-dependent reduction in the number of paw elevations in phase II. The blockade was almost complete in the cet-0.25 and cet-1 groups. Cetirizine did not show analgesic effects in phase I or after intraperitoneal administration.

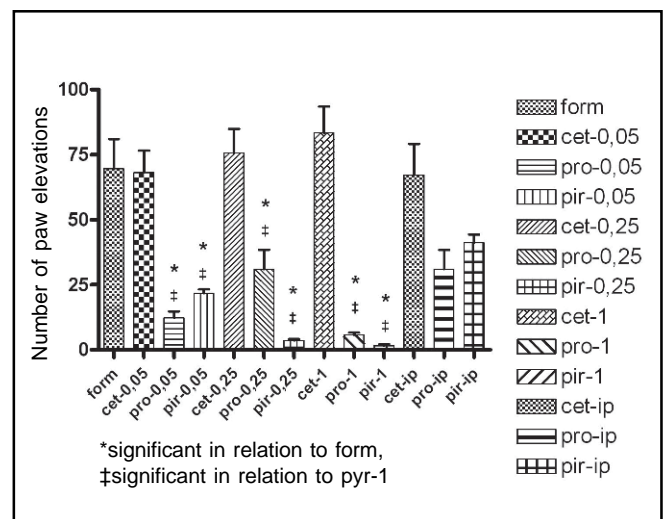


Figure 2A – Effects of the Local or Intraperitoneal Administration of  $H_1$  Receptor Antagonists on the Number of Paw Elevations in Phase I. Higher doses (0.25 and 1  $\mu\text{mol}$ ) of pyrilamine and promethazine blocked phase I, but not cetirizine or when the drugs were administered intraperitoneally. Results shown as mean  $\pm$  standard error,  $p < 0.05$ .

Significant differences among the drugs were not observed. The intraperitoneal administration of pyrilamine and cetirizine did not change the number of elevations, but promethazine led to a partial reduction (Figure 2B).

In the second part of the study, the drugs were tested for the presence of a clinically evident local anesthetic effect. In phase I, pyrilamine and promethazine decreased the number of paw elevations by 96.7% and 73.3% respectively, and cetirizine decreased by 23.9% which was not significant

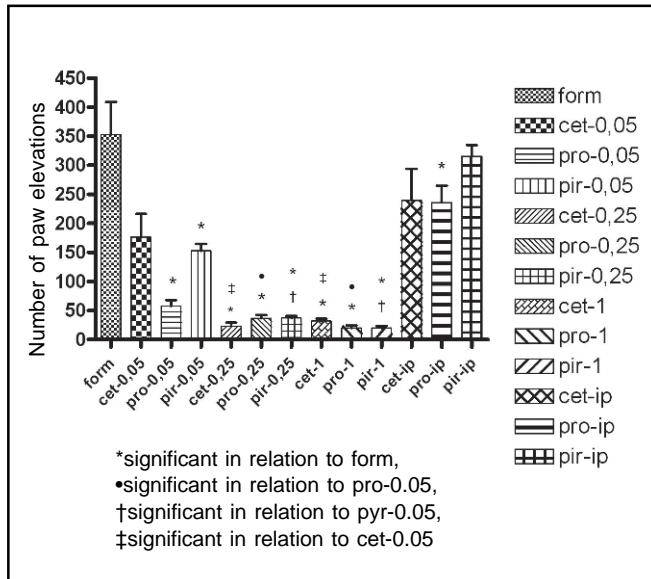


Figure 2B – Effects of the Local or Intraperitoneal Administration of  $H_1$  Receptor Antagonists on the Number of Paw Elevations in Phase II. Higher doses (0.25 and 1  $\mu$ mol) of the three drugs blocked phase II. The intraperitoneal administration of pyrilamine and cetirizine did not block phase II, and promethazine caused a partial blockade. Results shown as mean  $\pm$  standard error,  $p < 0.05$

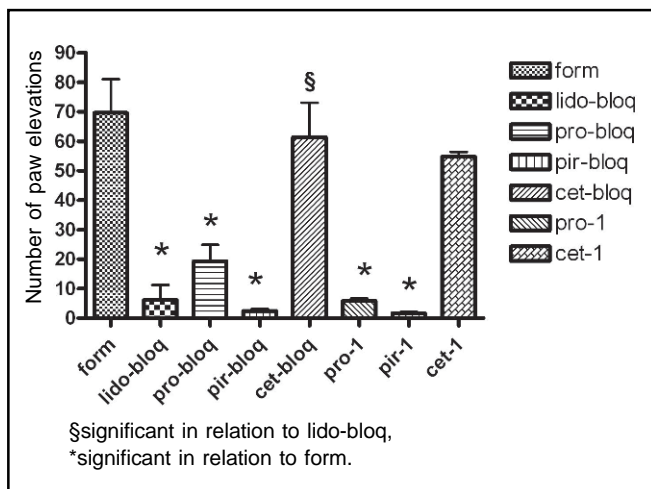


Figure 3A – Number of Paw Elevations After the Local Administration or Peripheral Nerve Block with Pyrilamine, Promethazine, and Cetirizine in Phase I. When used in peripheral nerve block, pyrilamine and promethazine blocked phase I, which was not different from the effects of lidocaine. When compared to lidocaine, cetirizine did not block phase I and showed no difference from formalin. Results shown as mean  $\pm$  standard error,  $p < 0.05$ .

when compared to the formalin group (Figure 3A). In phase II, pyrilamine and promethazine decreased the number of paw elevations by 86.6% and 64.4% respectively, while cetirizine decreased it by 19.9% which is not significant when compared to the formalin group (Figure 3B).

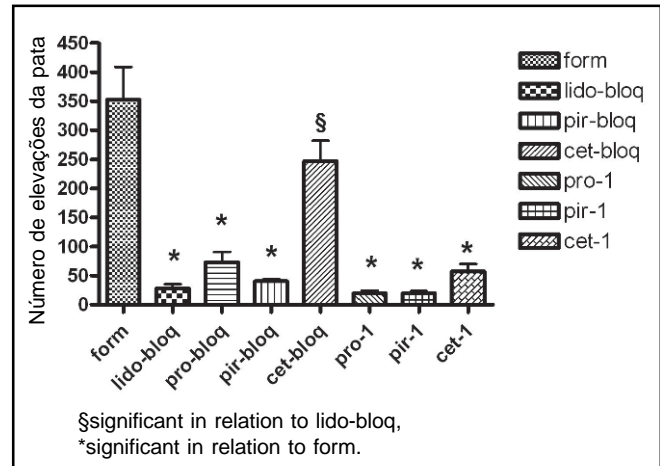


Figure 3B – Number of Paw Elevations in Phase II after Local Administration or Peripheral Nerve Block with Pyrilamine, Promethazine, and Cetirizine. When used in peripheral nerve block, pyrilamine and promethazine blocked phase I, showing no differences when compared to lidocaine. When compared to lidocaine, cetirizine did not block phase II and showed no differences from formalin. Results shown as mean  $\pm$  standard error,  $p < 0.05$ .

## DISCUSSION

In the present study the analgesic effects of three  $H_1$  receptor antagonists were evaluated in the formalin-induced pain model in rats. The number of paw elevations was used to quantify the painful behavior induced by formalin because it presents an important correlation with the classical formalin test and the cardiovascular changes induced by the response to pain induced by the administration of formalin in the paw. By presenting a reliable correlation with the painful behavior in awake animals not exposed to physical restriction and among the different stereotyped behaviors in the formalin test, the frequency of paw elevations has been widely used<sup>4,15,18-20,22-2</sup>.

Most studies on the analgesic effects of histamine receptor antagonists have focused on the central effects<sup>8,12,25-27</sup>. Studies on the peripheral analgesic effects are rare. Two studies explored the analgesic effects of  $H_1$  and  $H_2$  receptor antagonists, demonstrating important local analgesic effect of pyrilamine and, with lower intensity, cimetidine<sup>14,15</sup>. Pyrilamine blocked both phases of the formalin test, but it was not clear whether the effect observed was class- ( $H_1$  receptor antagonist) or pyrilamine-specific.

We tried to clarify this matter by studying three different  $H_1$  antagonists: pyrilamine, derived from aminopyridine, promethazine, derived from propilamine, and cetirizine, a newer antagonist derived from piperazine. All three  $H_1$  receptor antagonists demonstrated local analgesic effects; however, the action of cetirizine was different from the analgesic actions observed with pyrilamine and promethazine.



The effect observed in the second phase was expected, since this phase of the test is secondary to the local anti-inflammatory effects of formalin<sup>18,28,29</sup>. Histamine is one of the mediators released during inflammation and has pronociceptive effects. The anti-inflammatory action of H<sub>1</sub> receptor antagonists was observed with cetirizine, which blocked specifically phase II. The blockade of the first phase shown previously with pyrilamine<sup>14,15</sup> was also seen with promethazine. Those effects were not expected as a result of the action on H<sub>1</sub> receptors, since it is believed that phase I results from the direct activation of nociceptors by formalin<sup>30,31</sup>. However, some authors believe that this phase is also inflammatory similarly to phase II<sup>14</sup>. We do not believe that phase I is inflammatory and the fact that cetirizine did not block this phase may be an indication. We believe that the blockade in the first phase after the coadministration of pyrilamine and promethazine with formalin was too fast to be a result of an anti-inflammatory action. In phases I and II, the blockade cannot be attributed to systemic effects, since the intraperitoneal administration of those drugs did not affect the number of paw elevations.

Pyrilamine and promethazine showed analgesic effects similar to those of lidocaine, with analgesia when administered in peripheral nerve block. These data suggest that those H<sub>1</sub> receptor antagonists have local anesthetic action, explaining the complete blockade observed in phase I with both drugs. A local anesthetic effect has already been proposed for promethazine<sup>32</sup>, but not for pyrilamine.

According to the results of the present study, H<sub>1</sub> receptor antagonists showed local anesthetic effect of two natures; an anti-inflammatory effect, which antagonizes peripheral H<sub>1</sub> receptors (class-specific), and another similar to the local anesthetic effect, which seems to be drug-specific (pyrilamine and promethazine).

## REFERÊNCIAS – REFERENCES

01. Raffa RB - Antihistamines as analgesics. *J Clin Pharm Ther* 2001; 26:81-85.
02. Ash AS, Schild HO. - Receptors mediating some actions of histamine. *Br J Pharmacol Chemother* 1966;27:427-429.
03. Soll AH, Walsh JH - Regulation of gastric acid secretion. *Annu Rev Physiol*, 1979;41:35-53.
04. Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M et al. - Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev* 1991;71:1-51.
05. Oda T, Morikawa N, Saito Y et al. - Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 2000;275: 36781-36786.
06. Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL et al. - Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305:1212-1221.
07. Chung YH, Miyake H, Kamei C et al. - Analgesic effect of histamine induced by intracerebral injection into mice. *Agents Actions* 1984;15:137-142.
08. Malmberg-Aiello P, Lamberti C, Ghelardini C et al. - Role of histamine in rodent antinociception. *Br J Pharmacol* 1994;111: 1269-1279.
09. Brown RE, Stevens DR, Haas HL - The physiology of brain histamine. *Progr Neurobiol* 2001;63:637-672.
10. Galeotti N, Malmberg-Aiello P, Bartolini A et al. - H<sub>1</sub> receptor stimulation induces hyperalgesia through activation of the phospholipase C-PKC pathway. *Neuropharmacology* 2004;47: 295-303.
11. Thoburn KK, Hough LB, Nalwalk JW et al. - Histamine-induced modulation of nociceptive responses. *Pain* 1994;58:29-37.
12. Abacioglu N, Bediz A, Çakici I et al. - Antinociceptive effects of H1- and H2- antihistaminics in mice. *Gen Pharmac* 1993;24:1173-1176.
13. Passani MB, Lin JS, Hancock A et al. - The histamine H<sub>3</sub> receptor as a novel therapeutic target for cognitive and sleep disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:618-625.
14. Parada CA, Tambeli, CH, Cunha FQ et al. - The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience* 2001;102:937-944.
15. Ashmawi HA, Chambergo FS, Palmeira CCA et al. - Effects of pyrilamine and cimetidine on mRNA c-fos expression and nociceptive behaviour in rats. *Anesth Analg* 2003;97:541-546.
16. Zimmermann M - Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-110.
17. Wall PD - Vigilance in defense of animal welfare. *Pain* 1993;54:239.
18. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H et al. - Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989;38:347-352.
19. Wheeler-Aceto H, Cowan A - Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology* 1991;104:35-44.
20. Doak GJ, Sawinok J - Formalin induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience* 1997;80:939-949.
21. Dubuisson D, Dennis SG - The formalin test: a quantitative study of analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4:161-174.
22. Sousa AM, Franco PAB, Ashmawi HA et al. - Efeito analgésico local do tramadol em modelo de dor provocada por formalina em ratos. *Rev Bras Anestesiologia* 2008;58:371-379.
23. Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI - Persistent cardiovascular and behavioural nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. *J Neurosci* 1995;15:7575-7584.
24. Teng CJ, Abbott FV - The formalin test: a dose-response analysis at three developmental stages. *Pain* 1998;76:337-347.
25. Malmberg-Aiello P, Lamberti C, Ipponi A et al. - Evidence of hypernociception induction following histamine H1 receptor activation in rodents. *Life Sci* 1998;63:463-476.
26. Thurmond RL, Desai PJ, Dunford PJ et al. - A potent and selective histamine H4 receptor antagonists with anti-inflammatory properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;309:404-413.
27. Sakurada S, Watanabe H, Mizoguchi H et al. - Involvement of the histaminergic system in the nociceptin-induced pain-related behaviors in the mouse spinal cord. *Pain* 2004;112:171-182.
28. Coderre TJ, Vacarino AL, Melzack R - Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 1990;535:155-158.
29. Tjylsen A, Berge OG, Rosland JH et al. - The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51:5-17.
30. Hunskaar S, Hole K - The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987;30: 103-114.
31. Puig S, Sorkin LS - Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 1996;64:345-355.
32. Rumore MM, Schlichting DA - Analgesic effects of antihistaminics. *Life Sci* 1985;36:403-416.

**RESUMEN:**

Ashmawi HA, Braun LM, Sousa AM, Posso IP - Efecto Analgésico de Antagonistas del Receptor de la Histamina H1 en un Modelo de Dolor Provocado por Formalina en Ratones.

**JUSTIFICATIVA Y OBJETIVOS:** Los receptores de histamina intermedian las vías nociceptivas, principalmente en el sistema nervioso central. Algunos estudios arrojaron un efecto analgésico de antagonistas de receptor de histamina en el sistema nervioso periférico. No queda claro si el efecto analgésico local es de clase específico o un fármaco específico.

**MÉTODO:** Para responder a esa pregunta, utilizamos tres diferentes antagonistas del receptor H1 (pirilamina, prometazina y cetirizina), administrados directamente en la pata del ratón, por vía intraperitoneal o por bloqueo de nervio periférico en modelo de dolor inducido por formalina. Observamos el efecto de los fármacos en el comportamiento del número de elevaciones de la pata.

**RESULTADOS:** En la fase I, la pirilamina local redujo el número de elevaciones de la pata de forma dosis dependiente. En la dosis más alta, la reducción fue de un 97,8%. Para la prometazina, la disminución fue de un 92% y para la cetirizina de 23,9%. En la fase II, la pirilamina redujo el número de elevaciones de la pata en un 93,5%, la prometazina, un 78,2% y la cetirizina un 80,1%. La administración de los fármacos por vía intraperitoneal no alteró el comportamiento doloroso. Cuando se usaron para bloqueo del nervio periférico en la fase I, la pirilamina redujo el número de elevaciones de la pata en un 96,7%, la prometazina en un 73,3% y la cetirizina en un 23,9%. En la fase II, la pirilamina redujo un 86,6%, la prometazina un 64,4% y la cetirizina un 19,9%.

**CONCLUSIONES:** Los resultados mostraron que los antagonistas del receptor de la histamina H1 presentaron efectos analgésicos locales, diferentes del efecto sistémico, siendo uno de ellos antiinflamatorio y clase específico, y el otro específico para la prometazina y la pirilamina, parecido con el efecto clínico anestésico local.